

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

MPNТИ: 62.37.35

А.У. ИСАБЕК¹, А.К. БОПИ¹, Р.А. АХМЕТ², К.Т. СУЛТАНКУЛОВА¹, А.К. НАХАНОВ¹,
О.В. ЧЕРВЯКОВА^{1*}¹Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, Гвардейский,
Казахстан²Казахский Национальный Университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

*e-mail: ovch@mail.ru

МЕТОД ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ
ВИРУСОВ НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ВЕКТОРНЫХ
ВАКЦИН

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.04

Аннотация

Поксвирусы широко используются в качестве векторов при разработке вакцин против инфекционных заболеваний человека и животных. Ограниченный круг восприимчивых животных и непатогенность для человека каприпоксвирусов определяют огромный потенциал их использования в качестве вакцинных векторов. Технология получения рекомбинантных каприпоксвирусов может быть значительно улучшена путем сочетания временной доминантной селекции по гену *gpt Escherichia coli* (основан на устойчивости к микофеноловой кислоте) с дифференциальной экспрессией флуоресцентного белка.

Рекомбинантный вирус генерируется путем замены зеленого флуоресцирующего белка (в акцепторном вирусе) целевым геном в результате двух последовательных рекомбинаций ДНК. В процессе первого кроссинговера плазида интеграции с целевым геном встраивается в геном акцепторного вируса. В результате образуется нестабильная генетическая конструкция, которая может существовать только под селективным давлением микофеноловой кислоты. После снятия селективного давления происходит внутримолекулярная рекомбинация вирусного генома в участках гомологии, и образуются два типа вирусов: рекомбинант с целевым геном и исходный акцепторный вирус.

Вовлеченные вирусы (зеленый исходный, зеленый промежуточный и бесцветный конечный) визуализируются по-разному с помощью флуоресцентной микроскопии, что позволяет использовать простой и эффективный протокол отбора целевых рекомбинантов. Этот метод (замена генов «от зеленого к бесцветному») значительно сокращает время, необходимое для получения безмаркерного рекомбинантного каприпоксвируса.

Ключевые слова: вирус нодулярного дерматита, рекомбинация генома, вирусный вектор.

Вакцинация является основным методом профилактики инфекционных заболеваний. Несмотря на большое количество доступных препаратов, создание эффективных и безопасных вакцин все еще остается актуальной задачей. Одним из решений может стать генетическая иммунизация, в результате которой в организм доставляются гены, кодирующие целевые антигены патогенных микроорганизмов [1]. Экспрессия таких генов в организме имитирует вирусную инфекцию, вызывая иммунный ответ. Доставка целевых генов может осуществляться различными путями [2], среди которых использование вирусных векторов. Вирусные векторы, экспрессирующие гетерологичные антигены, сходны с аттенуированными живыми вирусными вакцинами, и в идеале должны обладать способностью включать в свой геном чужеродные гены целевых антигенов, промоторов и

адьювантов и стабильно их экспрессировать. Разработка вирусных векторов направлена на создание поливалентных вакцин, а также вакцин против основных болезней человека и животных, для которых до сих пор эффективные профилактические препараты отсутствуют.

Поксвирусы, сконструированные для экспрессии чужеродных генов, зарекомендовали себя как чрезвычайно ценные инструменты в современной биотехнологии при разработке как медицинских, так и ветеринарных вакцин. Геном с высокой емкостью для рекомбинантной ДНК [3], точный вирус-специфический контроль экспрессии генамишени, отсутствие персистенности или интеграции в геном хозяина [4], высокий уровень иммуногенности [5, 6], исключительная термостабильность, а также простота получения вектора и вакцины являются важными характеристиками, благодаря которым поксвирусы нашли широкое применение в качестве вакцинных векторов.

Вирус нодулярного дерматита относится к роду *Capripoxvirus* семейства *Poxviridae*. К роду *Capripoxvirus* относятся также вирусы оспы овец и оспы коз. Каприпоксвирусы имеют высокую генетическую гомологию [7, 8]. Атенуированные вакцинные штаммы каприпоксвирусов были успешно использованы в качестве векторов при разработке бивалентных вакцин [9, 10, 11]. Каприпоксвирусы имеют ограниченный круг восприимчивых животных и вызывают abortивные инфекции в организме непермиссивных животных. Однако даже в отсутствие репликации рекомбинантные каприпоксвирусы корректно экспрессируют чужеродные гены и вызывают длительные иммунные ответы у иммунизированных хозяев [12, 13]. Эти свойства делают каприпоксвирусы перспективными для разработки векторных вакцин против инфекционных заболеваний различных видов животных.

Способы получения рекомбинантных поксвирусов детально рассмотрены в ряде обзоров [14, 15]. Для селекции и отбора рекомбинантов используют маркерные гены. Это могут быть гены, обеспечивающие устойчивость к антибиотикам [16, 17, 18] или визуальные маркеры. Среди них ген бета-галактозидазы, экспрессия которого сопровождается окрашиванием бляшек вируса в синий цвет в присутствии 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal) [19, 20]; ген бета-глюкуронидазы в зависимости от используемого субстрата образует цветные или флуоресцентные продукты [21]. Более поздние исследования связаны с использованием флуоресцирующих белков [22, 23].

Наиболее перспективным направлением в селекции и отборе рекомбинантных поксвирусов является использование в качестве маркеров флуоресцирующих белков. В лаборатории молекулярной биологии и геной инженерии НИИ проблем биологической безопасности сконструированы векторные плазмидные ДНК и отработан способ получения рекомбинантных каприпоксвирусов методом гомологичной рекомбинации в условиях временной доминантной селекции с использованием в качестве селективного маркера гена *Escherichia coli*, кодирующего фермент ксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазу (*gpt*) [24]. Целью данных исследований являлась оптимизация отбора рекомбинантных вирусов нодулярного дерматита при разработке векторных вакцин.

Материалы и методы исследования

Клеточные культуры, использованные в этом исследовании, были предоставлены Лабораторией клеточной биотехнологии НИИ проблем биологической безопасности. Первичные клетки тестикул ягненка (ТЯ) культивировали при 37°C в 5% CO₂ в полусинтетической пристеночной среде (ПСП, НИИПББ, РК) с добавлением 10% (об./об.) эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС, Sigma, США).

В работе использовали рекомбинантный вирус нодулярного дерматита Atyrau-B, полученный в результате нокаута гена LSDV008 в геноме вирулентного штамма вируса *Dermatitis nodulares/2016/Atyrau/KZ*. Вирусы нодулярного дерматита размножали на клетках ТЯ с использованием среды ПСП, содержащей 2% ЭБС, в течение 7-10 дней при

37°C в 5% CO₂. Активность вируса определяли методом микротитрования в 96-луночных планшетах. Титр рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в lg ТЦД₅₀/см³.

Плазмиды интеграции pIN-LSDV066-EGFP и pIN-LSDV066-IL18 для встраивания гена зеленого флуоресцирующего белка (EGFP) или бычьего интерлейкина-18, соответственно, в локус тимидинкиназы вирусного генома были сконструированы как описано нами ранее [25].

Рекомбинантные вирусы получали путем гомологичной рекомбинации в условиях временной доминантной селекции, как описано ранее [24]. Вкратце, монослой клеток ТЯ инфицировали вирусом нодулярного дерматита Атугау-В или его производными в дозе 0,1 ТЦД₅₀/клетка в течение 2 ч, а затем трансфицировали соответствующей интеграционной плазмидой с использованием липофектамина 2000. Когда цитопатический эффект (ЦПЭ) достигал 80% (3-5 дней), клетки лизировали тремя циклами замораживания-оттаивания. Для обогащения трансфекционного пула рекомбинантными вирусами проводили 2-3 последовательных пассажа в селективной среде ПСП, содержащей 2% ЭБС, 2,5 мкг/мл микофеноловой кислоты, 25 мкг/мл ксантина и 1,5 мкг/мл гипоксантина. Отбор рекомбинантов проводили клонированием методами предельного разведения и бляшек. Рекомбинантные вирусы идентифицировали методом люминесцентной микроскопии и ПЦР. ПЦР-анализ проводили для определения гомогенности рекомбинантного вируса, т.е. полного отсутствия родительского вируса, с использованием праймеров RCR-ТК-F 5'-aattataggacstatgtttctggc-3' и RCR-ТК-R 5'-cagcgtctttataacattccat-3'. Размер продукта для исходного вируса составляет 413 п.о., со встроенным геном *egfp* – 1225 п.о., со встроенным геном *bIL-18* – 1085 п.о.

ПЦР проводили в 25 μ л, содержащих 5 μ л 5 \times реакционного буфера OneTaqStandard, 0,5 μ л 10 mM dNTP, по 1 μ л каждого праймера (10 пмоль/ μ л) и 0,125 μ л ДНК-полимеразы OneTaq (0,625 ед.), 1 μ л матричной ДНК (100 нг/ μ л) и стерильной дистиллированной воды до конечного реакционного объема. Матричную ДНК денатурировали в течение 30 с при 94°C, отжиг праймеров проводили при 50°C в течение 30 с, удлинение цепи проводили при 72°C в течение 90 с (30 циклов).

Для отбора бляшек вируса и оценки экспрессии зеленого флуоресцирующего белка рекомбинантным вирусом нодулярного дерматита использовали люминесцентный микроскоп Альтами ЛЮМ-2.

Экспрессию интерлейкина 18 рекомбинантным вирусом нодулярного дерматита подтверждали методом вестерн-блота, как описано ранее [24], с использованием поликлональных мышинных анти-bIL18 сывороток.

Результаты и обсуждение

Рекомбинация вирусного генома в условиях временной доминантной селекции происходит следующим образом. В процессе первого кроссинговера вся плазида интеграции встраивается в вирусный геном (рисунок 1А). В результате образуется нестабильная конструкция, которая может существовать только под селективным давлением микофеноловой кислоты. После снятия селективного давления происходит внутримолекулярная рекомбинация вирусного генома в участках гомологии и образуются два типа вирусов; рекомбинант с целевым геном и исходный вариант дикого типа. В некоторых случаях для выделения рекомбинанта требуется 10 и более раундов клонирования методом предельного разведения и бляшкообразования.

Для повышения эффективности отбора рекомбинантов мы разработали акцепторный вирус, в геном которого встроен маркерный ген флуоресцентного белка. При использовании акцепторного вируса для гомологичной рекомбинации в условиях временной доминантной селекции отбор рекомбинантов возможен уже через 2-3 раунда клонирования методом бляшек. Если бляшки акцепторного вируса и вирусов с нестабильным генетическим геномом флуоресцируют за счет экспрессии маркерного гена, бляшки рекомбинантного вируса остаются бесцветными при люминесцентной

микроскопии. Как видно из рисунка 1Б, в результате внутримолекулярной рекомбинации генома после снятия селективного давления образуются два типа вируса - флуоресцирующий и не флуоресцирующий («от зеленого к бесцветному»).

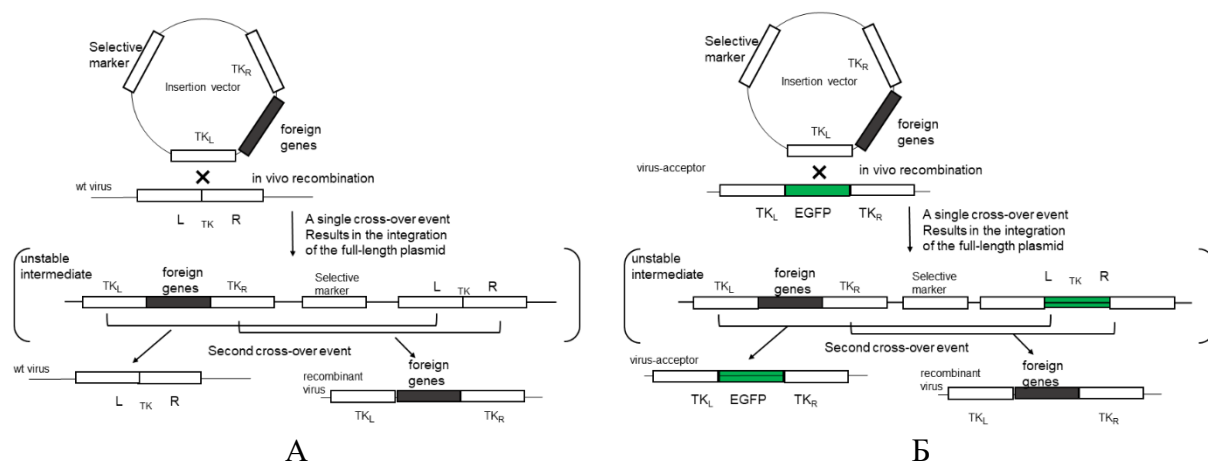
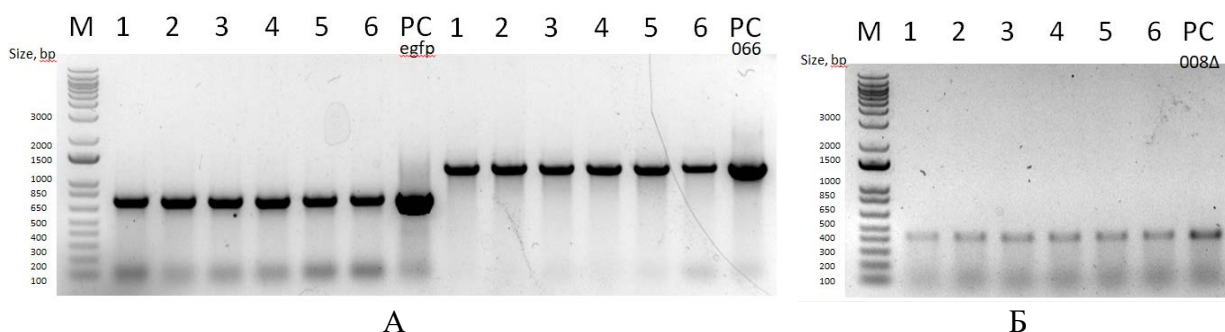


Рисунок 1 – Схема гомологичной рекомбинации вирусного генома в условиях временной доминантной селекции: прямое встраивание чужеродного гена (А) и встраивание чужеродного гена путем замены маркерного гена - стратегия "зеленый-бесцветный" (Б)

На первом этапе исследований нами был разработан вирус-акцептор. В геном вируса нодулярного дерматита Атырау-В был встроен ген зеленого флуоресцирующего белка. Для отбора рекомбинантных вирусов использовали люминесцентную микроскопию в комплексе с ПЦР. В результате было получено три клона рекомбинантных вирусов Атырау-ВJ(EGFP), содержащих в своем геноме ген зеленого флуоресцирующего белка. Генетическая стабильность была подтверждена путем последовательного пассирования рекомбинанта в течение 10 пассажей (рисунок 2А). Как видно из рисунка 2А, локус тимидинкиназы (LSDV066) остается стабильным в течение 10 пассажей, сохраняя встроенный чужеродный ген в своем составе.



А: анализ клонов рекомбинантного вируса Атырау-ВJ(EGFP) на наличие гена EGFP, структуры локуса LSDV066; 1-3 – ДНК клонов вируса после пятого пассажа, 4-6 – ДНК клонов вируса после десятого пассажа, PC – положительный контроль (плазмидная ДНК). Б: анализ клонов рекомбинантного вируса Атырау-ВJ(IL18) на наличие гена IL18, структуры локуса LSDV066; 1 – ДНК вируса после пятого пассажа, 2 – ДНК вируса после десятого пассажа, PC – положительный контроль (плазмидная ДНК).

Рисунок 2 – ПЦР анализ рекомбинантных вирусов после 5 и 10 пассажа

Экспрессию встроеного гена зеленого флуоресцирующего белка оценивали методом люминесцентной микроскопии. Установлено, что уже через три часа после инфицирования клеток рекомбинантным вирусом в монослое регистрируются отдельные

флуоресцирующие клетки (рисунок 3А). Со временем их число увеличивается (рисунок 3 Б и В) и через 24 ч флуоресцируют практически все клетки инфицированного монослоя (рисунок 3Г). При этом цитопатическое действие вируса можно наблюдать только к концу третьих – началу четвертых суток культивирования.

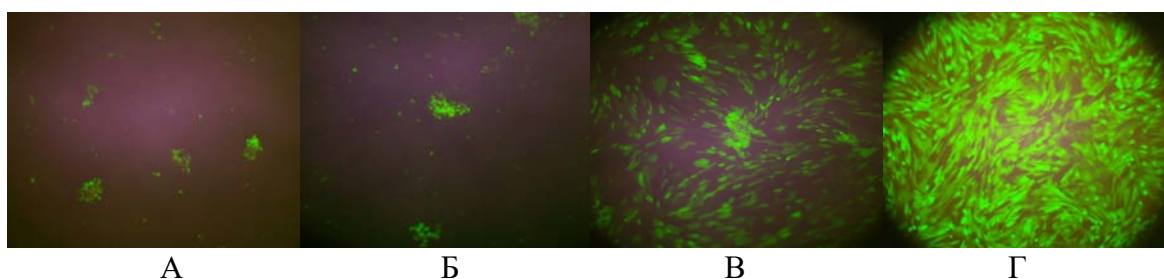
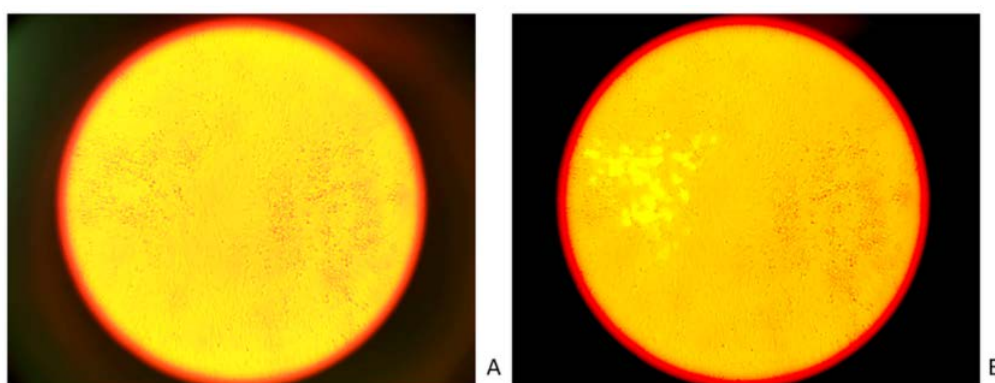


Рисунок 3 – Люминесцентная микроскопия монослоя клеток ТЯ через три (А), шесть (Б), двенадцать (В) и двадцать четыре часа (Г) после инфицирования рекомбинантным вирусом Atyrau-BJ(EGFP) (100×)

Таким образом, нами был получен акцепторный вирус Atyrau-BJ(EGFP), который мы использовали в дальнейшем для встраивания целевого гена, используя стратегию «от зеленого к бесцветному». В качестве целевого гена мы использовали последовательность мРНК, кодирующую бычий интерлейкин-18.

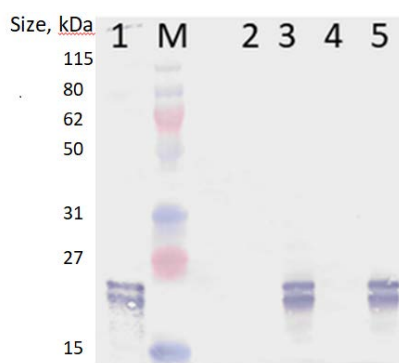
Монослой клеток ТЯ инфицировали акцепторным вирусом Atyrau-BJ(EGFP) и трансфицировали плазмидой интеграции pIN-LSDV066-IL18. Клеточный лизат после трансфекции клонировали методом бляшек под слоем агарозы. Бляшки анализировали световой и люминесцентной микроскопией (рисунок 4).



А – световая микроскопия, Б – одновременная люминесцентная и световая микроскопия

Рисунок 4 – Микроскопия бляшек, образованных в культуре клеток тестикул ягненка рекомбинантными вирусами нодулярного дерматита

Не флуоресцирующие бляшки накапливали и анализировали методом ПЦР. Для полного удаления акцепторного вируса полученные вирусные клоны были повторно клонированы. В результате был получен клон вируса Atyrau-BJ(bIL18) экспрессирующий бычий интерлейкин-18. В течение 10 последовательных пассажей вирус оставался генетически стабильным (рисунок 2Б). Об этом также свидетельствовала экспрессия интерлейкина-18, подтвержденная методом вестерн-блота (рисунок 5). Таким образом, с использованием стратегии «от зеленого к бесцветному» отбор рекомбинантных вирусов стал возможен за 2 раунда клонирования.



1 – бактериально экспрессированный интерлейкин 18 (положительный контроль), 2, 4 – неинфицированные клетки ТЯ, 3 – клетки, инфицированные вирусом Атырау-BJ(IL18), пассаж 5, 5 – клетки, инфицированные вирусом Атырау-BJ(IL18), пассаж 10

Рисунок 5 – Иммунодетекция интерлейкина 18, экспрессированного рекомбинантным вирусом нодулярного дерматита Атырау-BJ(IL18)

Подобные стратегии были использованы при получении рекомбинантных вирусов осповакцины. Di Lillo et al. [26] разработали способ получения рекомбинантов модифицированного вируса осповакцины путем сочетания временной селекции по диапазону хозяев (основанной на восстановлении в MVA делетированного гена осповакцины K1L) с дифференциальной экспрессией флуоресцентных белков. При этом используют два вида культур клеток - RK13 и ВНК-21. Три типа вовлеченных вирусов (красный исходный, зеленый промежуточный и бесцветный конечный рекомбинантный) визуализируют с помощью флуоресцентной микроскопии, что позволяет эффективно и быстро выделять рекомбинантные вирусы. Позднее авторы модифицировали метод очистки используя проточную цитометрию для сортировки клеток [27]. Barbieri et al. [28] использовали данный подход для получения множественных вставок в геном вируса осповакцины.

Заключение

Разработка векторных вакцин для профилактики инфекционных заболеваний животных и человека является перспективным направлением в вакцинологии. Вирус нодулярного дерматита, как и другие представители рода *Capripoxvirus*, имеют ограниченный круг хозяев и не патогенны для человека, что делает их уникальными векторами. Несмотря на простоту встраивания чужеродных последовательностей в геном поксвирусов, проблема отбора рекомбинантов остается актуальной. Разработка акцепторного вируса, экспрессирующего флуоресцирующий маркерный белок, и его использование при рекомбинации в условиях временной доминантной селекции по устойчивости к микофеноловой кислоте позволило значительно сократить число раундов клонирования при отборе рекомбинантов.

Таким образом, для повышения эффективности отбора рекомбинантных вирусов была разработана стратегия «от зеленого к бесцветному». Данная стратегия основана на замене маркерного гена зеленого флуоресцирующего белка целевым геном.

Финансирование

Работа выполнена в рамках проекта грантового финансирования AP08856376 «Совершенствование вакцинного вектора на основе каприпоксвируса» Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан

Литература:

- 1 Zuber P.L.F., Gruber M., Kaslow D.C., et al. Evolving pharmacovigilance requirements with novel vaccines and vaccine components. *BMJ Global Health*, 2021; 6: e003403 (doi: 10.1136/bmjgh-2020-003403)
- 2 *Antigen Delivery Systems: Immunological and Technological Issues*. B.Gander, H.P.Merkle, G.Corradin (eds.) Taylor & Francis e-Library, 2003 (doi: 10.3109/9780203304341)
- 3 Merchlinsky M., Moss B. Introduction of foreign DNA into the vaccinia virus genome by in vitro ligation: recombination-independent selectable cloning vectors. *Virology*, 1992, 190(1): 522-526 (doi: 10.1016/0042-6822(92)91246-q)
- 4 Mackett M., Smith G.L., Moss B. Vaccinia virus: A selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1982, 79: 7415-7419 (doi: 10.1073/pnas.79.23.7415)
- 5 Xie L., Li Y. Advances in vaccinia virus-based vaccine vectors, with applications in flavivirus vaccine development. *Vaccine*, 2022, 40(49): 7022–7031 (doi: 10.1016/j.vaccine.2022.10.047)
- 6 Pursell T., Spencer Clinton J.L., Tan J., Peng R., Ling P.D. Modified vaccinia Ankara expressing EEHV1A glycoprotein B elicits humoral and cell-mediated immune responses in mice. *PLoS one*, 2022, 17(3): e0265424 (doi: 10.1371/journal.pone.0265424)
- 7 Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Kutish G.F., Rock D. L. Genome of lumpy skin disease virus. *J. Virol.*, 2001, 75: 7122-7130 (doi: 10.1128/JVI.75.15.7122-7130.2001)
- 8 Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Sur J. H., Sandybaev N.T., Kerembekova U.Z., Zaitsev V.L., Kutish G.F., Rock D.L. The genomes of sheeppox and goatpox viruses. *J. Virol.*, 2002, 76: 6054-6061 (doi: 10.1128/jvi.76.12.6054-6061.2002)
- 9 Li J., Wang J., Guo Y., Gong Z., Cai X. A recombinant capripoxvirus expressing the F protein of peste des petits ruminants virus and the P12A3C of foot-and-mouth disease virus. *BMC veterinary research*, 2023, 19(1): 18 (doi: 10.1186/s12917-022-03529-5)
- 10 Fakri F., Bamouh Z., Ghzal F., Baha W., Tadlaoui K., Fihri O. F., Chen W., Bu Z., Elharrak M. Comparative evaluation of three capripoxvirus-vectored peste des petits ruminants vaccines. *Virology*, 2018, 514: 211-215 (doi: 10.1016/j.virol.2017.11.015)
- 11 Liu F., Fan X., Li L., Ren W., Han X., Wu X., & Wang Z. Development of recombinant goatpox virus expressing Echinococcus granulosus EG95 vaccine antigen. *Journal of Virological Methods*, 2018, 261: 28-33 (doi: 10.1016/j.jviromet.2018.08.002)
- 12 Burgers W. A., Ginbot Z., Shen Y. J., Chege G. K., Soares A. P., Müller T. L., Bunjun R., Kiravu A., Munyanduki H., Douglass N., & Williamson A. L. The novel capripoxvirus vector lumpy skin disease virus efficiently boosts modified vaccinia Ankara human immunodeficiency virus responses in rhesus macaques. *The Journal of general virology*, 2014, 95(Pt 10): 2267-2272 (doi: 10.1099/vir.0.067835-0)
- 13 Shen Y.J.; Shephard E.; Douglass N.; Johnston N.; Adams C.; Williamson C.; Williamson A.L. A novel candidate HIV vaccine vector based on the replication deficient Capripoxvirus, Lumpy skin disease virus (LSDV). *Virol. J.*, 2011, 8: 265 (doi: 10.1186/1743-422X-8-265)
- 14 Liu F., Zhang H., Liu W. Construction of recombinant capripoxviruses as vaccine vectors for delivering foreign antigens: Methodology and application. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 2019, 65: 181-188 (doi: 10.1016/j.cimid.2019.05.013)
- 15 Chervyakova O., Tailakova E., Sadikaliyeva S, Orynbayev M., Sultankulova K. Capripoxvirus vectors for vaccine development. *Gene Reports*, 2020, 21: 100890 (doi: 10.1016/j.genrep.2020.100890)
- 16 Franke C.A., Rice C.M., Strauss J.H., Hruby D.E. Neomycin resistance as a dominant selectable marker for selection and isolation of vaccinia virus recombinants. *Mol. Cell Biol.* 1985, 5(8): 1918-1924 (doi: 10.1128/mcb.5.8.1918-1924.1985)
- 17 Boshra H., Teffera M., Cao J., Babiuk S. Cloning Strategies for the Generation of Recombinant Capripoxvirus Through the Use of Screening and Selection Markers. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2022, 2465: 195-207 (doi: 10.1007/978-1-0716-2168-4_11)
- 18 Liu L., Cooper T., Eldi P., Garcia-Valtanen P., Diener K.R., Howley P.M., Hayball J.D. Transient dominant host-range selection using Chinese hamster ovary cells to generate marker-free recombinant viral vectors from vaccinia virus. *BioTechniques*, 2017, 62(4): 183-187 (doi: 10.2144/000114537)
- 19 Ye M., Keicher M., Gentshev I., Szalay A. A. Efficient Selection of Recombinant Fluorescent Vaccinia Virus Strains and Rapid Virus Titer Determination by Using a Multi-Well Plate Imaging System. *Biomedicines*, 2021, 9(8): 1032 (doi: 10.3390/biomedicines9081032)

20 Panicali D., Grzelecki A., Huang C. Vaccinia virus vectors utilizing the beta-galactosidase assay for rapid selection of recombinant viruses and measurement of gene expression. *Gene*, 1986, 47(2-3): 193-199 (doi: 10.1016/0378-1119(86)90063-6)

21 Carroll M.W., Moss B. E. coli beta-glucuronidase (GUS) as a marker for recombinant vaccinia viruses. *Biotechniques*, 1995, 19(3): 352-354, 356

22 Wallace D.B., Weyer J., Nel L.H., Viljoen G.J. Improved method for the generation and selection of homogeneous lumpy skin disease virus (SA-Neethling) recombinants. *J Virol Methods*, 2007, 146(1-2): 52-60 (doi: 10.1016/j.jviromet.2007.06.004)

23 Wallace D.B., Viljoen G.J. Immune responses to recombinants of the South African vaccine strain of lumpy skin disease virus generated by using thymidine kinase gene insertion. *Vaccine*, 2005, 23(23): 3061-3067 (doi: 10.1016/j.vaccine.2004.10.006)

24 Chervyakova O., Tailakova E., Kozhabergenov N., Sadikaliyeva S., Sultankulova K., Zakarya K., Maksyutov R.A., Strochkov V., Sandybayev N. Engineering of Recombinant Sheep Pox Viruses Expressing Foreign Antigens. *Microorganisms*, 2021, 9: 1005 (doi: 10.3390/microorganisms9051005)

25 Chervyakova O., Issabek A., Sultankulova K., Bopi A., Kozhabergenov N., Omarova Z., Tulendibayev A., Aubakir N., Orynbayev M. Lumpy skin disease virus with four knocked out genes was attenuated *in vivo* and protects cattle from infection. *Vaccines*, 2022, 10: 1705 (doi: 10.3390/vaccines10101705)

26 Di Lullo G., Soprana E., Panigada M., Palini A., Erfle V., Staib C., Sutter G., Siccardi A. G. Marker gene swapping facilitates recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara production by host-range selection. *Journal of virological methods*, 2009, 156: 37-43 (doi: 10.1016/j.jviromet.2008.10.026)

27 Di Lullo G., Soprana E., Panigada M., Palini A., Agresti A., Comunian C., Milani A., Capua I., Erfle V., Siccardi A.G. The combination of marker gene swapping and fluorescence-activated cell sorting improves the efficiency of recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine production for human use. *Journal of virological methods*, 2010, 163: 195-204 (doi: 10.1016/j.jviromet.2009.09.016)

28 Barbieri A., Panigada M., Soprana E., Di Mario G., Gubinelli F., Bernasconi V., Recagni M., Donatelli I., Castrucci M.R., Siccardi, A.G. Strategies to obtain multiple recombinant modified vaccinia Ankara vectors. Applications to influenza vaccines. *Journal of virological methods*, 2018, 251: 7-14 (doi: 10.1016/j.jviromet.2017.10.003)

А.У. ИСАБЕК¹, А.Қ. БОПИ¹, А.Р. АХМЕТ², К.Т. СУЛТАНКУЛОВА¹, А.К. НАХАНОВ¹,
О.В. ЧЕРВЯКОВА^{1*}

¹Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты, Гвардейский,
Қазақстан

²Әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті, Алматы, Қазақстан

*e-mail: ovch@mail.ru

ВЕКТОРЛЫҚ ВАКЦИНАЛАРДЫ ӨЗІРЛЕУ ҮШІН РЕКОМБИНАНТТЫ НОДУЛЯРЛЫ ДЕРМАТИТ ВИРУСТАРЫН АЛУДЫҢ ТИІМДІЛІГІН АРТТЫРУ ӘДІСІ

Түйін

Поксвирустар адам мен жануарлардың жұқпалы ауруларына қарсы вакциналарды жасауда вектор ретінде кеңінен қолданылады. Сезімтал жануарлардың шектеулі диапазоны және адам үшін каприпоксвирустардың патогенді болмауы оларды вакцина векторлары ретінде пайдаланудың үлкен мүмкіндіктерін анықтайды. Рекомбинантты каприпоксвирустарды алу технологиясын *gpt* *Escherichia coli* гені арқылы (микофенол қышқылына төзімділікке негізделген) уақытша доминантты селекцияны флуоресцентті ақуыздың дифференциалды экспрессиясымен біріктіру арқылы айтарлықтай жақсартуға болады.

Рекомбинантты вирус ДНҚ-ның екі дәйекті рекомбинациясы нәтижесінде жасыл флуоресцентті ақуызды (акцепторлық вируста) мақсатты генмен ауыстыру арқылы жасалады. Бірінші кроссинговер кезінде мақсатты ген мен интеграциялық плазмида акцепторлық вирустың геномына енгізіледі. Нәтижесінде тек микрофенол қышқылының селективті қысымында өмір сүре алатын тұрақсыз генетикалық құрылым қалыптасады. Селективті қысым жойылғаннан кейін гомологиялық аймақтарда вирустық геномның молекулалық рекомбинациясы жүреді және вирустардың екі түрі түзіледі: мақсатты гені бар рекомбинантты және бастапқы акцепторлық вирус.

Қолданылған вирустар (бастапқы жасыл, аралық жасыл және соңғы түссіз) флуоресцентті микроскопия арқылы әр түрлі көрінеді. Бұл мақсатты рекомбинанттарды таңдаудың қарапайым және тиімді әдістемесін қолдануға мүмкіндік береді. Бұл әдіс (гендерді «жасылдан түссізге» ауыстыру) маркерсіз рекомбинантты каприпоксвирусты алу үшін қажетті уақытты айтарлықтай қысқартады.

Кілтті сөздер: нодулярлы дерматит вирусы, геном рекомбинациясы, вирустық вектор.

IRSTI: 62.37.35

A.U. ISSABEK¹, A.K. BOPI¹, R.A. AKHMET², K.T. SULTANKULOVA¹,
A.K. NAKHANOV¹, O.V. CHERVYAKOVA^{1*}

¹Research Institute for Biological Safety Problems, Gvardeiskiy, Kazakhstan

²Kazakh National University named after Al-Farabi, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: ovch@mail.ru

METHOD OF INCREASING THE EFFICIENCY OF OBTAINING RECOMBINANT NODULAR DERMATITIS VIRUSES FOR THE DEVELOPMENT OF VECTOR VACCINES

doi:10.53729/MV-AS.2023. 02.04

Abstract

Poxviruses are widely used as vectors in the development of vaccines against infectious diseases in humans and animals. The limited range of susceptible animals and the non-pathogenicity of capripoxviruses to humans determine the great potential for their use as vaccine vectors. The technology for producing recombinant capripoxviruses can be greatly improved by combining transient dominant selection for the

gpt gene of *Escherichia coli* (based on resistance to mycophenolic acid) with differential expression of green fluorescent protein.

The recombinant virus is generated by replacing the green fluorescent protein (in the acceptor virus) with the target gene by two consecutive DNA recombinations. During the first crossover, the integration plasmid with the target gene is inserted into the genome of the acceptor virus. As a result, an unstable genetic construct is formed, which can only exist under the selective pressure of mycophenolic acid. After the selective pressure is removed, intramolecular recombination of the viral genome occurs in homology regions, and two types of viruses are formed: a recombinant with a target gene and an initial acceptor virus.

The viruses involved (green parent, green intermediate, and colorless final) are visualized differently by fluorescence microscopy, allowing for a simple and efficient protocol for selecting target recombinants. This method (replacement of genes "from green to colorless") significantly reduces the time required to obtain a marker-free recombinant capripoxvirus.

Keywords: lumpy skin disease virus, genome recombination, viral vector.

Vaccination is the main method of preventing infectious diseases. Despite the large number of available drugs, the development of effective and safe vaccines is still an urgent task. One of the decisions may be genetic immunization, as a result of which genes encoding target antigens of pathogenic microorganisms are delivered to the body [1]. The expression of such genes in the body mimics a viral infection by triggering an immune response. Delivery of target genes can be carried out in various ways [2], including the use of viral vectors. Viral vectors expressing heterologous antigens are similar to attenuated live viral vaccines and should ideally be able to incorporate foreign genes of target antigens, promoters and adjuvants into their genome and express them stably. The development of viral vectors is aimed at creating polyvalent vaccines, as well as vaccines against major human and animal diseases, for which there are still no effective preventive drugs.

Poxviruses engineered to express foreign genes have proven to be extremely valuable tools in modern biotechnology for the development of both medical and veterinary vaccines. Genome with high capacity for recombinant DNA [3], precise virus-specific control of target gene expression, lack of persistence or integration into the host genome [4], high level of immunogenicity [5, 6], exceptional thermostability, as well as ease of obtaining a vector and vaccine are important features that have made poxviruses widely used as vaccine vectors.

Lumpy skin disease virus belongs to the genus *Capripoxvirus* of the *Poxviridae* family. The genus *Capripoxvirus* also includes sheep pox and goat pox viruses. Capripoxviruses have high genetic homology [7, 8]. Attenuated vaccine strains of capripoxviruses have been successfully used as vectors in the development of bivalent vaccines [9, 10, 11]. Capripoxviruses have a limited range of susceptible animals and cause abortive infections in non-permissive animals. However, even in the absence of replication, recombinant capripoxviruses correctly express foreign genes and elicit sustained immune responses in immunized hosts [12, 13]. These properties make capripoxviruses promising for the development of vector vaccines against infectious diseases in various animal species.

Methods for obtaining recombinant poxviruses are considered in detail in a number of reviews [14, 15]. For selection and selection of recombinants, marker genes are used. These can be genes providing resistance to antibiotics [16, 17, 18] or visual markers. Among them, the beta-galactosidase gene, the expression of which is accompanied by blue staining of virus plaques in the presence of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal) [19, 20]; the beta-glucuronidase gene produces colored or fluorescent products depending on the substrate used [21]. More recent studies are associated with the use of fluorescent proteins [22, 23].

The most promising direction in the selection and isolation of recombinant poxviruses is the use of fluorescent proteins as markers. In the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Engineering of the Research Institute of Biological Safety Problems, vector plasmid DNAs were constructed and a method for obtaining recombinant capripoxviruses by homologous recombination under conditions of temporary dominant selection using the *Escherichia coli* gene encoding the enzyme xanthine-guanine phosphoribosyl transferase (*gpt*) as a selective marker was

developed [24]. The purpose of these studies was to optimize the selection of recombinant nodular dermatitis viruses in the development of vector vaccines.

Materials and methods of research

Cell cultures used in this study were provided by the Cell Biotechnology Laboratory of the Research Institute for Biological Safety Problems. Primary lamb testicular cells (LT) were cultured at 37°C in 5% CO₂ in a semi-synthetic near-wall medium (SNM, RIBSP, RK) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Sigma, USA).

We used the recombinant Lumpy skin disease virus Atyrau-B obtained as a result of knockout of the LSDV008 gene in the genome of the virulent strain Dermatitis nodulares/2016/Atyrau/KZ. Lumpy skin disease viruses were propagated on LT cells using SNM containing 2% FBS for 7–10 days at 37°C in 5% CO₂. Virus activity was determined by microtitering in 96-well plates. The titer was calculated according to the method of Reed and Mench and expressed in lg TCID₅₀/cm³.

Integration plasmids pIN-LSDV066-EGFP and pIN-LSDV066-IL18 for inserting the green fluorescent protein (EGFP) gene or bovine interleukin-18 (bIL-18), respectively, into the thymidine kinase locus of the viral genome were constructed as described by us previously [25].

Recombinant viruses were obtained by homologous recombination under transient dominant selection conditions, as described previously [24]. Briefly, a monolayer of LT cells was infected with Lumpy skin disease virus Atyrau-B or its derivatives at a dose of 0.1 TCID₅₀/cell for 2 h, and then transfected with the appropriate integration plasmid using Lipofectamine 2000. When the cytopathic effect (CPE) reached 80% (3–5 days), cells were lysed by three freeze-thaw cycles. To enrich the transfection pool with recombinant viruses, 2–3 successive passages were performed in selective SNM containing 2% FBS, 2.5 µg/ml mycophenolic acid, 25 µg/ml xanthine, and 1.5 µg/ml hypoxanthine. The selection of recombinants was performed by cloning methods of limiting dilution and plaques. Recombinant viruses were identified by fluorescence microscopy and PCR. PCR analysis was performed to determine the homogeneity of the recombinant virus, i.e. complete absence of the parental virus, using primers RCR-TK-F 5'-aattataggacatgttttctggc-3' and RCR-TK-R 5'-cagcgtcttttaataacattccat-3'. The size of the product for the parental virus is 413 bp, with the inserted EGFP gene - 1225 bp, with the inserted bIL-18 gene - 1085 bp.

PCR was performed in 25 µl containing 5 µl 5x OneTaqStandard reaction buffer, 0.5 µl 10 mM dNTP, 1 µl each primer (10 pmol/µl) and 0.125 µl OneTaq DNA polymerase (0.625 U), 1 µl template DNA (100 ng/µl) and sterile distilled water to the final reaction volume. Template DNA was denatured for 30 s at 94°C, primers were annealed at 50°C for 30 s, and the chain was extended at 72°C for 90 s (30 cycles).

To select virus plaques and evaluate the expression of green fluorescent protein by the recombinant lumpy skin disease virus, an Altami LUM-2 luminescent microscope was used.

Expression of interleukin 18 by recombinant lumpy skin disease virus was confirmed by Western blotting as described previously [24] using polyclonal mouse anti-bIL18 sera.

Results and discussion

Recombination of the viral genome under conditions of temporary dominant selection occurs as follows. During the first crossing over, the entire integration plasmid is inserted into the viral genome (Figure 1A). The result is an unstable construct that can only exist under the selective pressure of mycophenolic acid. After the selective pressure is removed, intramolecular recombination of the viral genome occurs in the regions of homology, and two types of viruses are formed: recombinant with the target gene and the original wild-type variant. In some cases, ten or more rounds of cloning by limiting dilution and plaque formation are required to isolate a recombinant virus.

To increase the efficiency of selection of recombinants, we have developed an acceptor virus with a fluorescent protein marker gene inserted into its genome. When using an acceptor virus for homologous recombination under conditions of temporary dominant selection, the selection of

recombinants is possible after 2-3 rounds of plaque cloning. If the plaques of the acceptor virus and viruses with an unstable genetic genome fluoresce due to the expression of the marker gene, the plaques of the recombinant virus remain colorless under fluorescence microscopy. As can be seen from Figure 1B, as a result of intramolecular recombination of the genome after the removal of selective pressure, two types of virus are formed - fluorescent and non-fluorescent ("from green to colorless").

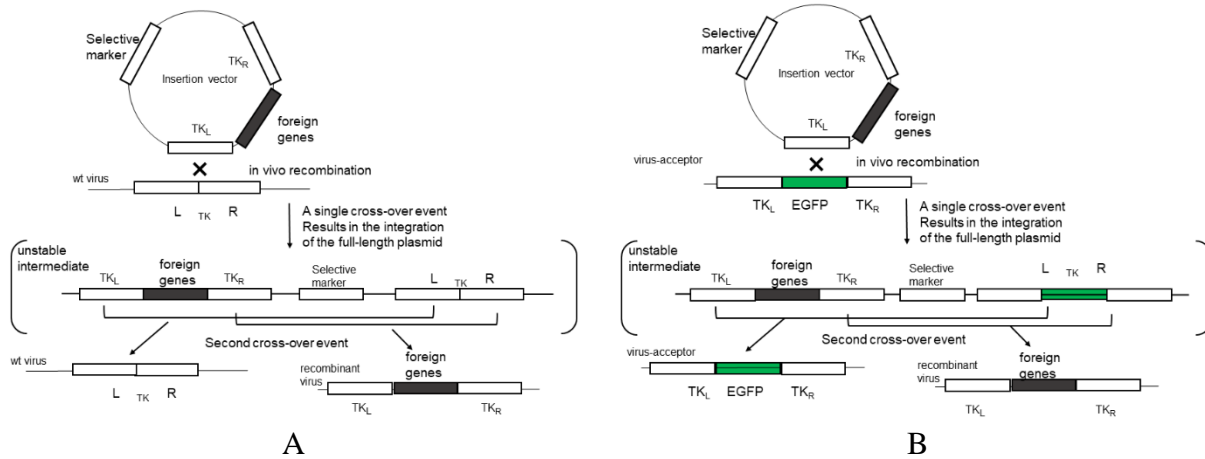
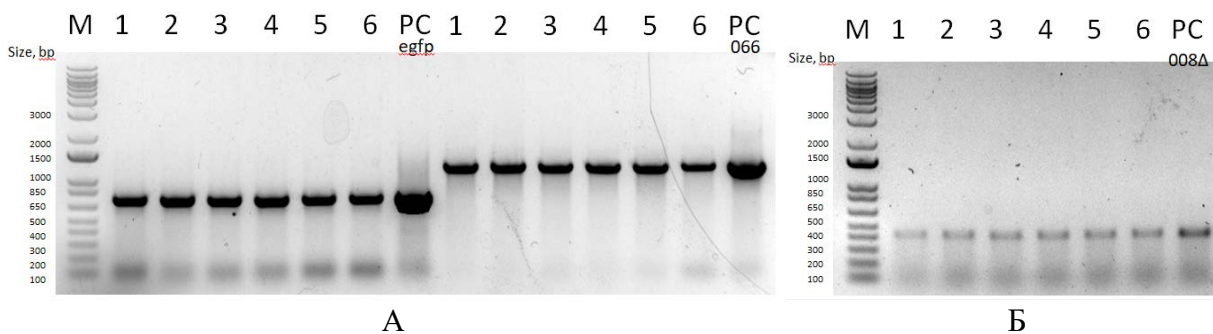


Figure 1 - Scheme of homologous recombination of the viral genome under conditions of temporary dominant selection: direct insertion of a foreign gene (A) and insertion of a foreign gene by replacing the marker gene - the "green to colorless" strategy (B)

At the first stage of research, we developed an acceptor virus. The green fluorescent protein gene has been inserted into the genome of the Atyrau-B lumpy skin disease virus. For the selection of recombinant viruses, fluorescent microscopy was used in combination with PCR. As a result, three clones of recombinant Atyrau-BJ(EGFP) viruses containing the green fluorescent protein gene in their genome were obtained. Genetic stability was confirmed by serial passaging of the recombinant for 10 passages (Figure 2A). As can be seen from Figure 2A, the thymidine kinase locus (LSDV066) remains stable for 10 passages, retaining the inserted foreign gene in its composition.



A: analysis of clones of the recombinant Atyrau-BJ(EGFP) virus for the presence of the EGFP gene, the structure of the LSDV066 locus; 1-3 - DNA of virus clones after the fifth passage, 4-6 - DNA of virus clones after the tenth passage, PC - positive control (plasmid DNA). B: analysis of clones of the recombinant Atyrau-BJ(IL18) virus for the presence of the IL18 gene, the structure of the LSDV066 locus; 1 - virus DNA after the fifth passage, 2 - virus DNA after the tenth passage, PC - positive control (plasmid DNA)

Figure 2 – PCR analysis of recombinant viruses after 5 and 10 passages

Expression of the inserted green fluorescent protein gene was assessed by fluorescent microscopy. It was found that individual fluorescent cells were registered in the monolayer as early as three hours after the cells were infected with the recombinant virus (Figure 3A). Over time, their number increases (Figures 3B and 3C), and after 24 h, almost all cells of the infected monolayer fluoresce (Figure 3D). In this case, the cytopathic effect of the virus can be observed only by the end of the third - the beginning of the fourth day of cultivation.

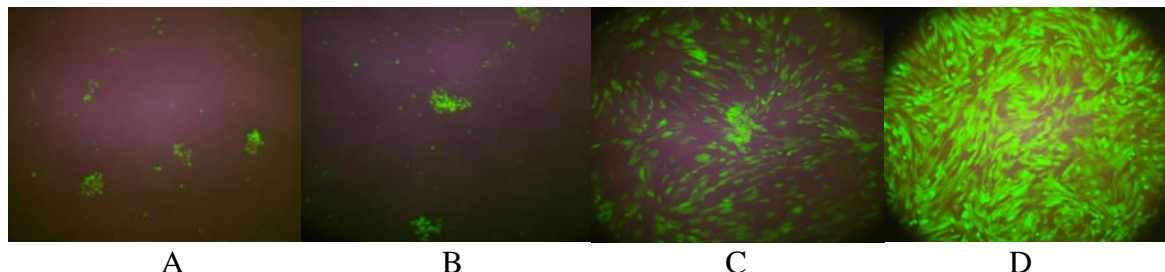
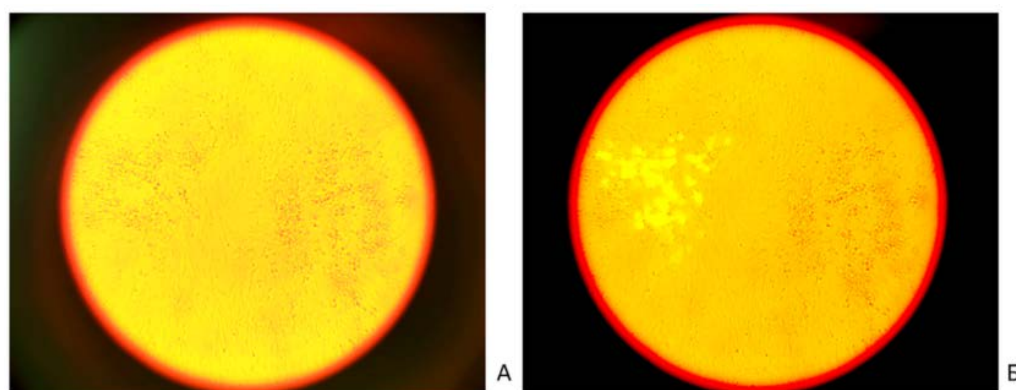


Figure 3 – Fluorescence microscopy of a monolayer of LT cells three (A), six (B), twelve (C) and twenty-four hours (D) after infection with the recombinant Atyrau-BJ(EGFP) virus (100×)

Thus, we obtained the Atyrau-BJ(EGFP) acceptor virus, which we further used to insert the target gene using the “green to colorless” strategy. We used the mRNA sequence encoding bovine interleukin-18 as the target gene.

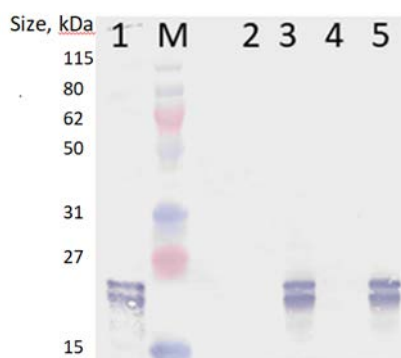
A monolayer of LT cells was infected with the Atyrau-BJ(EGFP) acceptor virus and transfected with the integration plasmid pIN-LSDV066-IL18. The cell lysate after transfection was cloned by the plaque method under a layer of agarose. The plaques were analyzed by light and fluorescent microscopy (Figure 4).



A - light microscopy, B - simultaneous fluorescent and light microscopy

Figure 4 – Microscopy of plaques formed in cell culture of lamb testicles by recombinant Lumpy skin disease viruses

Non-fluorescent plaques were expanded and analyzed by PCR. To completely remove the acceptor virus, the resulting viral clones were re-cloned. As a result, an Atyrau-BJ(bIL18) virus clone expressing bovine interleukin-18 was obtained. During 10 consecutive passages, the virus remained genetically stable (Figure 2B). This was also evidenced by the expression of interleukin-18, confirmed by Western blot (Figure 5). Thus, using the “green to colorless” strategy, the selection of recombinant viruses became possible in two rounds of cloning.



1 - bacterially expressed interleukin 18 (positive control), 2, 4 - uninfected LT cells, 3 - cells infected with Atyrau-BJ(IL18) virus, after the fifth passage, 5 - cells infected with Atyrau-BJ(IL18) virus, after tenth passage

Figure 5 – Immunodetection of interleukin 18 expressed by the recombinant Lumpy skin disease virus Atyrau-BJ(IL18)

Similar strategies have been used in the production of recombinant vaccinia viruses. Di Lillo et al. [26] developed a method for obtaining modified vaccinia virus recombinants by combining transient selection for host range (based on the restoration of the deleted vaccinia K1L gene in MVA) with differential expression of fluorescent proteins. In this case, two types of cell cultures RK13 and BHK-21 are used. The three types of viruses involved (red parent, green intermediate, and colorless final recombinant) are visualized using fluorescence microscopy, allowing efficient and rapid isolation of recombinant viruses. Later, the authors modified the purification method using flow cytometry for cell sorting [27]. Barbieri et al. [28] used this approach to obtain multiple inserts into the vaccinia virus genome.

Conclusion

The development of vector vaccines for the prevention of infectious diseases in animals and humans is a promising direction in vaccinology. Lumpy skin disease virus, like other members of the *Capripoxvirus* genus, has a limited host range and is not pathogenic to humans, which makes them unique vectors. Despite the ease of insertion of foreign sequences into the genome of poxviruses, the problem of selection of recombinants remains relevant. The development of an acceptor virus expressing a fluorescent marker protein and its use in recombination under conditions of temporary dominant selection for resistance to mycophenolic acid made it possible to significantly reduce the number of cloning rounds in the selection of recombinants.

Thus, in order to increase the efficiency of selection of recombinant viruses, a “green to colorless” strategy was developed. This strategy is based on the replacement of the green fluorescent protein marker gene with the target gene.

Funding

The study was carried out within the framework of the grant funding project AP08856376 “Capripoxvirus-based vaccine vector improvement” of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan

References:

1 Zuber P.L.F., Gruber M., Kaslow D.C., et al. Evolving pharmacovigilance requirements with novel vaccines and vaccine components. *BMJ Global Health*, 2021; 6: e003403 (doi: 10.1136/bmjgh-2020-003403)

2 *Antigen Delivery Systems: Immunological and Technological Issues*. B.Gander, H.P.Merkle, G.Corradin (eds.) Taylor & Francis e-Library, 2003 (doi: 10.3109/9780203304341)

- 3 Merchlinsky M., Moss B. Introduction of foreign DNA into the vaccinia virus genome by in vitro ligation: recombination-independent selectable cloning vectors. *Virology*, 1992, 190(1): 522-526 (doi: 10.1016/0042-6822(92)91246-q)
- 4 Mackett M., Smith G.L., Moss B. Vaccinia virus: A selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1982, 79: 7415-7419 (doi: 10.1073/pnas.79.23.7415)
- 5 Xie L., Li Y. Advances in vaccinia virus-based vaccine vectors, with applications in flavivirus vaccine development. *Vaccine*, 2022, 40(49): 7022–7031 (doi: 10.1016/j.vaccine.2022.10.047)
- 6 Pursell T., Spencer Clinton J.L., Tan J., Peng R., Ling P.D. Modified vaccinia Ankara expressing EEHV1A glycoprotein B elicits humoral and cell-mediated immune responses in mice. *PloS one*, 2022, 17(3): e0265424 (doi: 10.1371/journal.pone.0265424)
- 7 Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Kutish G.F., Rock D. L. Genome of lumpy skin disease virus. *J. Virol.*, 2001, 75: 7122-7130 (doi: 10.1128/JVI.75.15.7122-7130.2001)
- 8 Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Sur J. H., Sandybaev N.T., Kerembekova U.Z., Zaitsev V.L., Kutish G.F., Rock D.L. The genomes of sheeppox and goatpox viruses. *J. Virol.*, 2002, 76: 6054-6061 (doi: 10.1128/jvi.76.12.6054-6061.2002)
- 9 Li J., Wang J., Guo Y., Gong Z., Cai X. A recombinant capripoxvirus expressing the F protein of peste des petits ruminants virus and the P12A3C of foot-and-mouth disease virus. *BMC veterinary research*, 2023, 19(1): 18 (doi: 10.1186/s12917-022-03529-5)
- 10 Fakri F., Bamouh Z., Ghzal F., Baha W., Tadlaoui K., Fihri O. F., Chen W., Bu Z., Elharrak M. Comparative evaluation of three capripoxvirus-vectored peste des petits ruminants vaccines. *Virology*, 2018, 514: 211-215 (doi: 10.1016/j.virol.2017.11.015)
- 11 Liu F., Fan X., Li L., Ren W., Han X., Wu X., & Wang Z. Development of recombinant goatpox virus expressing Echinococcus granulosus EG95 vaccine antigen. *Journal of Virological Methods*, 2018, 261: 28-33 (doi: 10.1016/j.jviromet.2018.08.002)
- 12 Burgers W. A., Ginbot Z., Shen Y. J., Chege G. K., Soares A. P., Müller T. L., Bunjun R., Kiravu A., Munyanduki H., Douglass N., & Williamson A. L. The novel capripoxvirus vector lumpy skin disease virus efficiently boosts modified vaccinia Ankara human immunodeficiency virus responses in rhesus macaques. *The Journal of general virology*, 2014, 95(Pt 10): 2267-2272 (doi: 10.1099/vir.0.067835-0)
- 13 Shen Y.J.; Shephard E.; Douglass N.; Johnston N.; Adams C.; Williamson C.; Williamson A.L. A novel candidate HIV vaccine vector based on the replication deficient Capripoxvirus, Lumpy skin disease virus (LSDV). *Virol. J.*, 2011, 8: 265 (doi: 10.1186/1743-422X-8-265)
- 14 Liu F., Zhang H., Liu W. Construction of recombinant capripoxviruses as vaccine vectors for delivering foreign antigens: Methodology and application. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 2019, 65: 181-188 (doi: 10.1016/j.cimid.2019.05.013)
- 15 Chervyakova O., Tailakova E., Sadikaliyeva S, Orynbayev M., Sultankulova K. Capripoxvirus vectors for vaccine development. *Gene Reports*, 2020, 21: 100890 (doi: 10.1016/j.genrep.2020.100890)
- 16 Franke C.A., Rice C.M., Strauss J.H., Hruby D.E. Neomycin resistance as a dominant selectable marker for selection and isolation of vaccinia virus recombinants. *Mol. Cell Biol.* 1985, 5(8): 1918-1924 (doi: 10.1128/mcb.5.8.1918-1924.1985)
- 17 Boshra H., Tefferu M., Cao J., Babiuk S. Cloning Strategies for the Generation of Recombinant Capripoxvirus Through the Use of Screening and Selection Markers. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2022, 2465: 195-207 (doi: 10.1007/978-1-0716-2168-4_11)
- 18 Liu L., Cooper T., Eldi P., Garcia-Valtanen P., Diener K.R., Howley P.M., Hayball J.D. Transient dominant host-range selection using Chinese hamster ovary cells to generate marker-free recombinant viral vectors from vaccinia virus. *BioTechniques*, 2017, 62(4): 183-187 (doi: 10.2144/000114537)
- 19 Ye M., Keicher M., Gentschev I., Szalay A. A. Efficient Selection of Recombinant Fluorescent Vaccinia Virus Strains and Rapid Virus Titer Determination by Using a Multi-Well Plate Imaging System. *Biomedicines*, 2021, 9(8): 1032 (doi: 10.3390/biomedicines9081032)
- 20 Panicali D., Grzelecki A., Huang C. Vaccinia virus vectors utilizing the beta-galactosidase assay for rapid selection of recombinant viruses and measurement of gene expression. *Gene*, 1986, 47(2-3): 193-199 (doi: 10.1016/0378-1119(86)90063-6)
- 21 Carroll M.W., Moss B. E. coli beta-glucuronidase (GUS) as a marker for recombinant vaccinia viruses. *Biotechniques*, 1995, 19(3): 352-354, 356

22 Wallace D.B., Weyer J., Nel L.H., Viljoen G.J. Improved method for the generation and selection of homogeneous lumpy skin disease virus (SA-Neethling) recombinants. *J Virol Methods*, 2007, 146(1-2): 52-60 (doi: 10.1016/j.jviromet.2007.06.004)

23 Wallace D.B., Viljoen G.J. Immune responses to recombinants of the South African vaccine strain of lumpy skin disease virus generated by using thymidine kinase gene insertion. *Vaccine*, 2005, 23(23): 3061-3067 (doi: 10.1016/j.vaccine.2004.10.006)

24 Chervyakova O., Tailakova E., Kozhabergenov N., Sadikaliyeva S., Sultankulova K., Zakarya K., Maksyutov R.A., Strochkov V., Sandybayev N. Engineering of Recombinant Sheep Pox Viruses Expressing Foreign Antigens. *Microorganisms*, 2021, 9: 1005 (doi: 10.3390/microorganisms9051005)

25 Chervyakova O., Issabek A., Sultankulova K., Bopi A., Kozhabergenov N., Omarova Z., Tulendibayev A., Aubakir N., Orynbayev M. Lumpy skin disease virus with four knocked out genes was attenuated *in vivo* and protects cattle from infection. *Vaccines*, 2022, 10: 1705 (doi: 10.3390/vaccines10101705)

26 Di Lullo G., Soprana E., Panigada M., Palini A., Erfle V., Staib C., Sutter G., Siccardi A. G. Marker gene swapping facilitates recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara production by host-range selection. *Journal of virological methods*, 2009, 156: 37-43 (doi: 10.1016/j.jviromet.2008.10.026)

27 Di Lullo G., Soprana E., Panigada M., Palini A., Agresti A., Comunian C., Milani A., Capua I., Erfle V., Siccardi A.G. The combination of marker gene swapping and fluorescence-activated cell sorting improves the efficiency of recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine production for human use. *Journal of virological methods*, 2010, 163: 195-204 (doi: 10.1016/j.jviromet.2009.09.016)

28 Barbieri A., Panigada M., Soprana E., Di Mario G., Gubinelli F., Bernasconi V., Recagni M., Donatelli I., Castrucci M.R., Siccardi, A.G. Strategies to obtain multiple recombinant modified vaccinia Ankara vectors. Applications to influenza vaccines. *Journal of virological methods*, 2018, 251: 7-14 (doi: 10.1016/j.jviromet.2017.10.003)